



**Avaliação de Isolados de *Trichoderma* na  
Promoção de Crescimento, Produção de Ácido  
Indolacético in vitro e Colonização Endofítica de  
Mudas de Eucalipto**

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 226***

***Avaliação de Isolados de *Trichoderma* na  
Promoção de Crescimento, Produção de Ácido  
Indolacético in vitro e Colonização Endofítica de  
Mudas de Eucalipto***

Magno Rodrigues Carvalho Filho

Sueli Corrêa Marques de Mello

Renato Popov dos Santos

José Eustáquio Menêzes

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –  
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

**Presidente:** *Miguel Borges*

**Secretária-Executiva:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** *Diva Maria de Alencar Dusi*  
*Luiz Adriano Maia Cordeiro*  
*José Roberto de Alencar Moreira*  
*Regina Maria Dechechi G. Carneiro*  
*Samuel Rezende Paiva*

**Suplentes:** *João Batista Tavares da Silva*  
*Margot Alves Nunes Dode*

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Normalização Bibliográfica:** *Ligia Sardinha Fortes*

**Editoração eletrônica:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Figura da Capa.** Enraizamento e crescimento de clones de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em substrato tratado com os isolados de *Trichoderma* (CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498 e CEN 500) com aspersões adicionais com suspensões fúngicas. A testemunha não recebeu tratamento com o fungo.

1ª edição

1ª impressão (2008):

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

---

A 945 Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético in vitro e colonização endofítica de mudas de eucalipto. / Magno Rodrigues Carvalho Filho ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

- p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 226).

1. *Trichoderma*. 2. Eucalipto. 3. Muda. I. Carvalho Filho, Magno Rodrigues. II. Série.

634.97342 – CDD 21

---

© Embrapa 2008

# Sumário

<b>Resumo</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Introdução</b> .....	7
<b>Material e Métodos</b> .....	8
<b>Resultados e Discussão</b> .....	10
<b>Conclusões</b> .....	15
<b>Referências</b> .....	15

# **Avaliação de Isolados de *Trichoderma* na Promoção de Crescimento, Produção de Ácido Indolacético in vitro e Colonização Endofítica de Mudanças de Eucalipto**

***Magno Rodrigues Carvalho Filho***<sup>1</sup>

***Sueli Corrêa Marques de Mello***<sup>2</sup>

***Renato Popov dos Santos***<sup>3</sup>

***José Eustáquio Menêzes***<sup>4</sup>

## **Resumo**

*Trichoderma* são fungos habitantes de solo e, geralmente, vivem em ambientes próximos às raízes de plantas, no rizoplane ou na rizosfera. Os isolados de *Trichoderma* não são patogênicos às plantas e podem sobreviver endofiticamente em várias espécies botânicas, podendo produzir substâncias que auxiliem a planta, tanto no controle de fitopatógenos como na promoção de crescimento. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar a promoção de crescimento em mudas de *Eucalyptus urophilla* e de clones híbridos G-100 (*Eucalyptus grandis* x *E. urophilla*); avaliar cinco isolados de *Trichoderma* quanto à produção de ácido indolacético in vitro e quanto à capacidade de colonização endofítica em mudas de eucalipto. Observou-se que o isolado CEN 262 (*Trichoderma harzianum*) promoveu aumento significativo da massa seca das raízes, parte aérea e a altura de plantas, nas duas espécies de eucalipto. Os isolados CEN 209, CEN 500 e CEN 262, em ordem crescente, demonstraram produção de AIA in vitro, sendo que a concentração do fitohormônio foi 19 vezes maior, nos filtrados de culturas de CEN 262, em relação ao CEN 209. Os isolados CEN 162, CEN 262, CEN 498 foram recuperados de tecidos internos de raízes. Termos para indexação: *Eucalyptus*, miniestacas, fitohormônio.

---

<sup>1</sup> Biólogo, M.Sc., Universidade de Brasília

<sup>2</sup> Eng. Agr., Doutora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>3</sup> Biologia, graduação, Universidade de Brasília

<sup>4</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## Evaluation of *Trichoderma* isolates in growth promoting, acid indolacetic production *in vitro* and endophytic capacity in seedlings of eucalyptus

### Abstract

*Trichoderma* spp. are fungi inhabitants of soil and generally live in environments close of the plants roots, in rizoplane or rhizosphere. The *Trichoderma* isolates are not pathogenic to the plants and can survive endophytically in various botanical species and may produce substances that help the plant, as in the control of the plant pathogens as the growth promoting. The goals of this study were: to evaluate the growth promotion in seedlings of *Eucalyptus urophilla* and clones hybrids G-100 (*Eucalyptus urophilla* x *E. grandis*); evaluate five *Trichoderma* isolates as the production of indolacetic acid and in their capacity of endophytic colonization in seedlings of eucalyptus. It was observed that the CEN 262 isolate (*Trichoderma harzianum*) promoted significant increase in the dry mass of roots, shoots and height of plants on two species of eucalyptus. The CEN 209, CEN 500 and CEN 262 isolates, in ascending order, showed the IAA production *in vitro*, and the concentration of phytohormone was 19 times greater in filtered cultures of CEN 262, in relation to the CEN 209. The CEN 162, CEN 262, CEN 498 isolates were recovered from internal tissues of roots.

Index terms: *Eucalyptus*, minicuttings, phytohormone.

## Introdução

Propagação vegetativa, por meio de estaquia, constitui a principal forma de multiplicação do eucalipto em escala comercial. Essa estratégia de multiplicação clonal tem sido vantajosa, pois mantém características desejáveis, sem a variabilidade encontrada em árvores obtidas a partir de sementes, o que resulta em otimização da área de jardim clonal e em maior grau de juvenilidade e de enraizamento (HIGASHI et al., 2000). A silvicultura clonal tem como ponto de partida a seleção de genótipos superiores para, posteriormente, proceder-se à propagação clonal massal (OLIVEIRA et al., 2006). Segundo Mafia et al. (2005), na propagação clonal do eucalipto por miniestaquia, devem ser considerados dois importantes fatores: a produção de brotos para a estaquia e a capacidade de enraizamento do material genético. Nesse sentido, todos os esforços devem ser despendidos para maximizar esses dois fatores. Assim, toda tecnologia que aperfeiçoe as condições de crescimento e produção das minicepas favorece diretamente a capacidade produtiva do viveiro.

As condições ambientais para a multiplicação clonal de miniestacas de eucalipto são, também, altamente favoráveis ao desenvolvimento e disseminação de *Cylindrocladium* spp. Esse patógeno pode causar tombamento e manchas foliares geralmente pequenas, circulares e arroxeadas, distribuídas sobre o limbo foliar, às vezes confundidas com aquelas incitadas por fitobactérias e *Phaeophleospora epicoccooides* (ALFENAS et al., 2004).

Fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os organismos mais estudados como antagonistas, principalmente, de patógenos de solo. Embora os mecanismos de ação desses fungos não estejam totalmente elucidados, alguns vêm sendo citados, tais como: micoparasitismo; produção de compostos inibitórios; competição por nutrientes e por espaço; promoção de crescimento, pela produção de hormônios vegetais ou por solubilização de nutrientes; e, resistência das plantas as doenças (HARMAM, 2000; BENÍTEZ et al., 2004; MARCO et al., 2004; GRAVEL et al., 2007).

Outra característica importante apresentada por certos isolados de *Trichoderma* é a capacidade de colonizar, endofiticamente, diferentes órgãos das plantas (RUBINI et al., 2005; SILVA et al., 2006). O habitat associado à planta é um ambiente dinâmico, onde vários fatores exercem influência na composição e estrutura das comunidades microbianas presentes ou em interação com as raízes e outras partes vegetais (SANOGO et al., 2002).

Este trabalho teve como objetivos avaliar isolados de *Trichoderma* spp. quanto à promoção de crescimento, produção de ácido indolacético e capacidade de colonização de mudas de eucalipto.

## Material e Métodos

### Preparo e obtenção de inóculo de *Trichoderma* spp. para os testes in vivo

Cinco isolados de *Trichoderma* spp. foram selecionados para os experimentos in vivo, com base em resultados obtidos no biocontrole de *Cylindrocladium scoparium* Morgan: *T. harzianum* (CEN 262 e CEN 500), *T. asperellum* (CEN 162), *T. atroviride* (CEN 498) e *T. pseudokoningii* (CEN 209). Estes antagonistas fazem parte da Coleção de agentes de controle biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

O inóculo para os ensaios foi produzido em grãos de arroz parboilizado, utilizando, como inóculo-semente, discos de culturas desenvolvidas em meio BDA. Os grãos de arroz, previamente umedecidos com água destilada a 60% (p/v), foram distribuídos em sacos plásticos de polipropileno (300 g de arroz seco/saco), sendo estes vedados com grampos, e autoclavado (120°C, durante 20 minutos). Cada saco recebeu, assepticamente, oito discos (5 mm de diâmetro cada) das colônias de *Trichoderma*. No fechamento, os sacos receberam tampões de gaze e algodão para permitir a troca gasosa com o ambiente externo. A incubação ocorreu em incubadora B.O.D. à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. A cada dois dias, o substrato foi revolvido para promover a troca gasosa, aumentar a superfície de contato do fungo com o substrato, promovendo a quebra do micélio para aumentar a taxa de esporulação dos isolados de *Trichoderma* spp. Após sete dias de incubação, o substrato de cada saco foi lavado com água corrente para a extração dos conídios. A concentração de conídios foi determinada em câmara de Neubauer e ajustada a  $10^7$  conídios/mL.

Os experimentos foram conduzidos em dois viveiros comerciais de mudas de eucalipto, um em sistema de minijardim clonal, localizados nos município de Luziânia (GO) e outro, com a produção de mudas por sementes, localizado em Patos de Minas (MG). Foram adicionados 100 mL da suspensão fúngica ( $10^7$  conídios/mL) em 30 quilos de substrato composto por casca de arroz carbonizada e vermiculita na proporção de 1:1, previamente enriquecido com macro e micronutrientes (45 g do adubo comercial Osmocote), seguido da homogeneização em misturador do tipo betoneira. Tubetes com volume de 50 cm<sup>3</sup>, previamente esterilizados, conforme o método descrito por Alfenas (1999), foram preenchidos com essa mistura. No minijardim clonal, em Luziânia (GO), cada tubete com o substrato recebeu uma estaca do clone híbrido G-100 (*Eucalyptus urophilla* x *E. grandis*). As estacas foram acondicionadas em casa de enraizamento, dotada de sistema de irrigação por nebulização. Decorridos 20 dias, as mudas foram transferidas para uma área com 50% de sombreamento, onde permaneceram por 10 dias. Ao completar 30 dias de idade, as mudas foram transferidas para canteiros a céu aberto, recebendo duas aplicações foliares com suspensões de *Trichoderma* spp. ( $10^7$  conídios/mL), com intervalo de 30 dias. No viveiro não protegido, em Patos de Minas (MG), os tubetes contendo substrato inoculado com *Trichoderma* spp., preparado como descrito anteriormente, após receberem as sementes da espécie *Eucalyptus camadulensis* foram mantidos

em canteiros a céu aberto, com irrigação por aspersão. Após a germinação, foi feito o desbaste, deixando uma planta por tubete. As mudas receberam aplicações mensais de suspensão de *Trichoderma* spp., como no experimento anterior, conduzido nas mudas de clones G-100 de eucalipto em Luziânia (GO).

Em ambos os experimentos, em laboratório, as plantas foram avaliadas quanto à altura, considerando as raízes e as partes aéreas, com o auxílio de régua milimetrada. As raízes foram separadas na região do colo e lavadas, drenando-se o excesso de água. Foram colocadas em estufa à 70°C, separadamente, raízes e parte aérea, tomando-se os valores de massa seca, após secagem por 48 horas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso com dez repetições, sendo que cada repetição foi composta por uma muda de eucalipto.

Os dados obtidos foram avaliados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa de estatística SISVAR (FERREIRA, 2000).

#### **Produção de Ácido Indolacético por *Trichoderma* spp.**

Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos experimentos de promoção de crescimento (CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498 e CEN 500) foram transferidos para frascos de 250 mL, contendo 100 mL de meio BD (Batata Dextrose). Como inóculo, utilizaram-se cinco discos de 5 mm de diâmetro, retirados da zona de crescimento de colônias, com cinco dias de idade. As culturas foram incubadas em estufas incubadoras (Lab-line incubator-shaker modelo NT 711), com agitação a 150 rpm, à temperatura de 25°C, durante sete dias. Após esse período, a parte líquida foi coletada por filtração a vácuo, utilizando papel de filtro (14 µm). Os filtrados das culturas foram distribuídos em tubos de ensaio e adicionados de reagente de Salkowski, composto por 150 mL de HClO<sub>4</sub>, 250 mL de água destilada e 7,5 mL de 0,5 M de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, na proporção 1:2 (v/v), de acordo com a metodologia descrita por Gravel et al. (2007). Foram utilizados dois controles negativos: 1) tubo de ensaio, contendo 1 mL do filtrado e 2 mL de água destilada; 2) tubo de ensaio, contendo 1 mL de água destilada e 2 mL do reagente de Salkowski. Os tubos de ensaio, contendo as soluções, foram agitados por 30 segundos e, então, incubados à temperatura ambiente, por 20 minutos.

A produção de ácido indolacético (AIA) foi avaliada em espectrofotômetro, com absorvância de 535 nm (GRAVEL et al., 2007). As determinações de AIA de cada amostra foram realizadas utilizando-se três Erlenmeyers para cada tratamento.

#### **Colonização endofítica de *Trichoderma* spp. em mudas de eucalipto**

Utilizaram-se mudas de eucalipto procedentes de viveiro comercial de Luziânia (GO). As mudas cultivadas em tubetes e com 90 dias idade foram tratadas com os isolados de *Trichoderma* spp. CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498 e CEN 500 (três aplicações, uma com tratamento do substrato e duas pulverizações). Em laboratório, as mudas foram lavadas em água corrente, sem ferí-las e descartando-se as danificadas. A desinfecção superficial das partes das plantas deu-se

através de lavagens por imersão, como a seguir: duas vezes em água destilada esterilizada por 30 segundos, seguida de solução de álcool etílico a 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio a 3% por 4 minutos, novamente em solução de álcool etílico a 70% por 30 segundos e três vezes em água destilada por 1 minuto, para retirar os resquícios dos esterilizantes, conforme utilizado por Pimentel et al. (2006).

Em dez plantas amostradas, foram utilizados quatro pedaços de cada parte da planta obtidas da seguinte maneira: as folhas foram cortadas em discos de 5 mm; os caules, em fragmentos de 3 a 5 mm e as raízes, em fragmentos de 1 a 2 cm. Os materiais vegetais foram plaqueados e misturados de acordo com cada parte da planta. Em seguida, foram colocados em meio BDA e incubados em câmara B.O.D. a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas, durante 5 dias. Também foram plaqueadas amostras retiradas de plantas com as mesmas características do ensaio, porém, não tratadas com *Trichoderma*. Foram realizadas três repetições para cada parte das plantas inseridos nas placas de Petri, por amostra.

## Resultados e Discussão

Nos experimentos de avaliação *Trichoderma* spp. como promotor de crescimento, conduzidos com o clone G-100 (Tabela 1), os isolados CEN 162 e CEN 262 apresentaram as maiores médias de massa seca de raiz e parte aérea, diferindo significativamente das testemunhas. Os incrementos médios chegaram a 136% do peso seco de raiz e parte aérea em relação à testemunha. Para os isolados CEN 209 e CEN 498, os valores médios de massa seca

Tabela 1. Promoção de crescimento de mudas de clone híbrido G-100 (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*), Luziânia, GO<sup>(1)</sup>.

Isolados	Massa seca (g)		Altura (cm)
	Raiz	Parte aérea	
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	0,52 a	1,54 a	38,8 b
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	0,35 bc	1,1 bc	37,9 b
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	0,54 a	1,66 a	44,2 a
CEN 498 - <i>T. atroviride</i>	0,36 b	1,16 b	36,8 b
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	0,28 bc	0,84 cd	32,7 c
Testemunha	0,22 c	0,7 d	30,8 c
C.V.	29,1	26,2	17,35

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

de raiz e parte aérea de incremento foram intermediários. O isolado CEN 500, por sua vez, não diferiu significativamente da testemunha, não tratada com *Trichoderma* (Figura 1).



**Figura 1.** Enraizamento e crescimento de clones de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em substrato tratado com os isolados de *Trichoderma* (CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498 e CEN 500) com aspersões adicionais com suspensões fúngicas. A testemunha não recebeu tratamento com o fungo.

Em termos de desenvolvimento de parte aérea, o isolado CEN 262 diferiu significativamente de todos isolados, com plantas mais robustas, o que resultou em um aumento médio de altura de 43% em relação à testemunha. As plantas tratadas com os isolados CEN 162, CEN 209 e CEN 498 mostraram-se, em média, 22,7% maiores do que a testemunha e não diferiram significativamente do isolado CEN 500 e da testemunha.

No experimento conduzido no município de Patos de Minas (MG), com mudas geradas a partir de sementes de *E. camadulensis* (Tabela 2), nas análises estatísticas revelaram que as médias dos pesos de matéria seca de raízes e partes aéreas das plantas tratadas com o isolado CEN 262 (*T. harzianum*) foram significativamente superiores às plantas tratadas com os demais isolados de *Trichoderma* spp.. O incremento médio de matéria seca, obtido com esse isolado, foi de 37,5% em relação à testemunha. Os isolados CEN 162, CEN 209, CEN 498 e CEN 500 não diferiram significativamente dos valores médios das testemunhas, em termos de matéria seca, tanto de raiz como da parte aérea.

Tabela 2. Promoção de desenvolvimento em mudas de *E. camadulensis* por isolados de *Trichoderma*, Patos de Minas, MG<sup>(1)</sup>.

Isolados	Massa seca (g)		Altura (cm)
	Raiz	Parte aérea	
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	0,4 b	1,0 cd	26,7 a
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	0,45 ab	0,9 cd	19,0 b
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	0,55 a	1,5 a	29,7 a
CEN 498 - <i>T. harzianum</i>	0,4 b	1,12 bc	27,5 a
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	0,4 b	0,6 cd	20,5 b
Testemunha	0,4 b	0,7 cd	20,7 b
C.V.	25,9	34,2	24,1

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

As plantas tratadas com os isolados CEN 162, CEN 262 e CEN 498 apresentaram alturas semelhantes à da testemunha. Já aquelas tratadas com os isolados CEN 209 e CEN 500 mostraram crescimento menor que o apresentado pela testemunha.

Os experimentos conduzidos nas duas localidades apresentaram diferentes resultados, indicando respostas diferenciadas aos isolados de *Trichoderma* spp. em relação ao uso de clone e sementes na produção de mudas. Ousley et al. (1993) relataram resultados evidenciando respostas diferenciadas a isolados de *Trichoderma*, sobre o crescimento de alface e trigo. Esses autores utilizaram isolados produtores de viridiol, um antibiótico que, aparentemente, teve efeito negativo na germinação de alface (*Lactuca sativa* L.) e outros isolados, produtores de ácidos graxos e glicerol, que atuaram positivamente no crescimento de trigo (*Triticum aestivum* L.). Harman (2000) mostrou, em estudos conduzidos em casa de vegetação e campo, que aplicações de *Trichoderma* (T-22) no solo aumentou a taxa de desenvolvimento do tomateiro. Esse autor postula que esse efeito encontrado em seus estudos seja pelo controle da microbiota deletéria as raízes, já que foi constatada a colonização dos pelos radiculares pelo *Trichoderma* ou, ainda, pela ação direta, sobre as plantas, de metabólitos não identificados, produzidos pelo antagonista. Resende (2004) verificou com um isolado de *T. harzianum*, maior acúmulo de matéria seca nas raízes das plantas de milho oriundas de sementes inoculadas. As raízes das plantas apresentaram sinais da colonização pelo *Trichoderma*. Lynck (1991) relatou o potencial do *Trichoderma* como agente biológico na agricultura, pela habilidade em estimular o crescimento de plantas, visto que esse proporcionou um aumento de 27 a 54% do peso fresco de alface. Tsahouridou e Thanassouloupoulos (2001) observaram que isolados de *T. koningii* promoveram significativamente maior emergência de sementes de tomate e, também, aumento de peso seco e fresco em relação às plantas não tratadas com *Trichoderma*. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os dados obtidos por diferentes autores, mostrando o grande potencial de uso agrícola desse fungo.

A partir da metodologia adotada por Gravel et al. (2007) observaram-se diferenças na produção de AIA entre os isolados de *Trichoderma* (Figura 2). Entretanto, outros fatores podem estar envolvidos na promoção de crescimento como controle de microrganismos deletérios de raízes e solubilização de nutrientes por agentes de controle biológico. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, os isolados CEN 162 e CEN 498 não apresentaram produção de AIA em níveis detectáveis, enquanto que nos isolados CEN 209 e CEN 500, esse hormônio foi detectado em baixos níveis. O isolado CEN 262 revelou níveis consideravelmente superiores em relação aos demais isolados, por exemplo, 19 vezes mais produção de AIA do que a detectada com o CEN 209 (Figura 2).

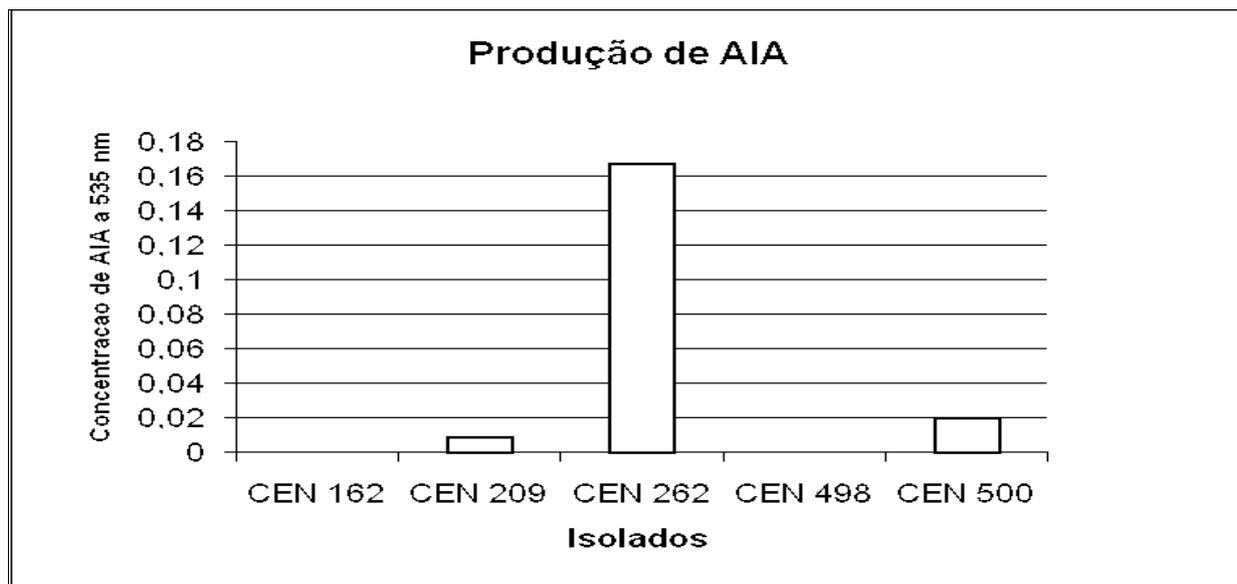


Figura 2. Produção de AIA pelos isolados de *Trichoderma* spp. a 535 nm de absorvância.

A concentração elevada de AIA verificada nas análises de filtrado de cultura do isolado CEN 262 são compatíveis com os valores obtidos nos experimentos relativos ao desenvolvimento de miniestacas de eucalipto clonal, que atingiu aumento de 137%, 145% e 43% de parte aérea, raiz e altura das plantas, respectivamente, comparados à testemunha. Esse dado está em concordância com os resultados descritos por Gravel et al. (2007) que encontraram correlação entre a produção de AIA in vitro, por um isolado de *T. atroviride* in vitro, e a promoção de crescimento de plantas de tomate tratadas com o fungo, em cultivo hidropônico. Esses autores sugeriram a produção desse fitohormônio como mecanismo usados por alguns isolados de *Trichoderma*, que resultaria em maior enraizamento e crescimento de plantas e que, também, constituiria estratégia do hiperparasita em suas interações antagonistas. Esse postulado encontra sustentação no trabalho conduzido por Roco e Pérez (2001), ao demonstrar que a adição de AIA no meio de cultura não teria afetado o desenvolvimento de *T. harzianum*, mas teria reduzido o crescimento radial de colônias de *Alternaria alternata*.

Outros estudos devem ser desenvolvidos para demonstrar a possível correlação entre produção de AIA e promoção de crescimento de mudas de eucalipto, no caso específico do isolado CEN

262. Vale lembrar, entretanto, que filtrado de cultura do isolado CEN 162, embora não tenha mostrado presença de AIA pelo método de análise utilizado, demonstrou efeito altamente positivo no desenvolvimento das miniestacas de eucalipto, tanto da parte aérea como das raízes, nos ensaios conduzidos com o híbrido G-100. De acordo com Bjorkman (2004), as taxas de crescimento de raízes de milho com alta sensibilidade a AIA podem ser reduzidas com adição desse fitohormônio, enquanto que a adição de AIA exógeno nas raízes de milho com baixa sensibilidade a esse fitohormônio pode resultar em maior taxa de crescimento. Parece razoável, sugerir que mudas de *E. camadulensis* apresentam menor sensibilidade ao AIA exógeno produzidos pelos isolados de *Trichoderma* em relação aos clones, já que as mudas obtidas de sementes e tratadas com o isolado CEN 262 apresentaram incremento médio em produção de raízes, de 37,5% . Por outro lado, as mudas tratadas com os isolados CEN 209 e CEN 500, produtores de AIA, não diferiram significativamente das testemunhas. As mudas clonais tratadas com esses mesmos isolados, por sua vez, apresentaram ganhos médios de peso seco de raízes, que variaram de 136% (CEN 262) a 27% (CEN 500).

As tentativas de localizar *Trichoderma* nas mudas de clones híbridos de eucaliptos G-100, revelaram ausência de qualquer indício de colonização pelo fungo, em todas as partes os órgãos das mudas clonais de eucalipto, à exceção das raízes daquelas que foram tratadas com os isolados CEN 162, CEN 262 e CEN 498 (Tabela 3).

Tabela 3. Detecção da presença endofítica de *Trichoderma* em mudas híbridas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* tratadas com isolados de *Trichoderma* spp.<sup>(1)</sup>.

Plantas tratadas	Partes das plantas		
	Folhas	Caules	Raízes
Isolados			
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	-	-	+
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	-	-	-
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	-	-	+
CEN 498 - <i>T. harzianum</i>	-	-	+
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	-	-	-
Testemunha	-	-	-

<sup>(1)</sup>Ausência (-) e (+) presença de *Trichoderma* spp..

Os antagonistas que apresentaram efeito positivo no desenvolvimento das mudas clonais de eucalipto foram os mesmos detectados colonizando raízes das mudas, ou seja, os isolados que não promoveram desenvolvimento de mudas, não foram capazes de colonizar as raízes. Fungos do gênero *Trichoderma* têm sido encontrados colonizando, endofiticamente, plantas de diversas famílias botânicas, sem causar doenças ou, auxiliando a planta a controlar patógenos. Souza et al. (2004) isolaram inúmeros fungos endofíticos de plantas tóxicas da Amazônia, *Palicourea longiflora* Rich e *Strychnos cogens* Bentham, inclusive *Trichoderma*, comprovando, atividades biocontroladoras desses isolados endofíticos, contra vários patógenos de plantas. Evans et al. (2003), por outro lado, não obtiveram sucesso no re-isolamento de espécies de *T. harzianum* e *T.*

*spirale* de folhas, embora esse fungo tenha sido isolado a partir de galhos e frutos de *Theobroma gileri*. De acordo com os autores, os isolados obtidos mostraram eficiência contra *Crinipellis roreri*. Portanto, os isolados de *Trichoderma* com presença endofítica nas raízes de eucalipto, provavelmente, desempenham algum tipo de relação mutualística com essas plantas.

## Conclusões

1. Os isolados CEN 209, 262 e 500 de *Trichoderma* revelaram produção do fitohormônio AIA, em testes de filtrados de colônias com o reagente de Salkowski.
2. O isolado CEN 262 de *T. harzianum*, que apresenta maior produção do fitohormônio AIA, demonstra capacidade de colonizar raízes das mudas de eucalipto do clone G-100.
3. O isolado CEN 262 proporciona o maior índice de desenvolvimento em raízes e partes aéreas das mudas de eucaliptos.

## Referências

- ALFENAS, A. C. Mofo-cinzeno, causado por *Botrytis cinerea* (Persoon ex Fries) em estacas e microestacas de *Eucalyptus* sp., resistência a benomil e erradicação de inóculo do patógeno com água quente. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 4, p. 497-500, 1999.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 442p.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v. 7, p. 249-260, 2004.
- BJORKMAN, T. Effect of *Trichoderma* colonization on auxin-mediated regulation of root elongation. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, NL, v. 43, p. 89-92, 2004.
- EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; THOMAS, S. E. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Progress**, Tubingen, Germany, v. 2, p. 149-160, 2003.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programa e resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, NY, v. 39, p. 1968-1977, 2007.
- HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 84, p. 377-393, 2000.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil.** Piracicaba, SP: IPEF, 2000. (Circular técnica, n. 192). 11 p.

LYNCK, J. M.; WILSON, K. L.; OUSLEY, M. A.; WHIPPS, J. M. Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, GB, v. 12, p. 59-61, 1991.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; ZARPELON, T. G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratado com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, p. 843-851, 2005.

MARCO, S. D.; OSTI, F.; CESARI, A. Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. **Phytopathology Mediterranea**, *Bolonia*, v. 43, p. 108-115, 2004.

OLIVEIRA, M. L.; XAVIER, A.; SANTOS, A. P.; ANDRADE, H. B. Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho de clones silvicultural de clones híbridos de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, p. 503-512, 2006.

OUSLEY, M. A.; LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M. Effects of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. **Microbial Ecology**, New York, v. 26, p. 277-285, 1993.

PIMENTEL, I. C.; KUCZKOWSKI, F. R.; CHIME, M. A.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, Curitiba, PR, v. 36, p. 123-128, 2006.

RESENDE, M. L. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 28, p. 793-798, 2004.

ROCO, A.; PÉREZ, L. M. *In vitro* biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, Chile, v. 4, p. 1-6, 2001.

RUBINI, M. R.; RIBEIRO, R. T. S.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biology Science**, Bethesda, US, v. 1, p. 24-33, 2005.

SANOGO, S.; POMELLIA, A.; HEBBAR, P. K.; BAILEY, B.; COSTA, J. C. B.; SAMUELS, G. J.; LUMSDEN, R. D. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on cacao. **Phytopatology**, v. 92, p. 1032-1037, 2002.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, SP, v. 23, p. 649-655, 2006.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, p. 185-195, 2004.

TSAHOURIDOU, P. C.; THANASSOULOPOULOS, C. C. Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, NY, v. 34, p. 767-776, 2001.